

JERZY MAZURCZAK, BARBARA OW CZARCZYK, JAN GRABOWSKI, MICHAŁ MAZURKIEWICZ

Próba zastosowania HPN do profilaktyki i leczenia kokcydiozy drobiu

Z Instytutu Zoohigieny i Profilaktyki w Produkcji Zwierzęcej
Wydziału Zootechnicznego SGGW-AR w WarszawieZ Instytutu Chorób Zakaźnych Wydziału Weterynaryjnego
AR we Wrocławiu

Antymetabolity kwasu foliowego (AFK) należące do pochodnych 2,4-dwuamino-pirymidyny wykazują wysoką selektywność w stosunku do reduktaz kwasu dwuhydrofoliowego (DHFR), izolowanych z organizmów należących do różnych klas taksonomicznych i gatunków. Obszerne piśmiennictwo na ten temat pozwala odpowiednio ukierunkować AKF dla poszczególnych grup taksonomicznych. Ukierunkowanie to opiera się przede wszystkim na określaniu wrażliwości DHFR komórek bakteryjnych na te związki, bowiem charakterystyka DHFR jest poznana w znacznie mniejszym stopniu.

Na temat wrażliwości DHFR izolowanych z komórek bakteryjnych istnieją dość liczne doniesienia. Wrażliwość reduktaz izolowanych z pasożytów pierwotniaczych poznana jest niezbyt dokładnie (7, 16).

Wiadomo, że również u pierwotniaków można łączyć efekt terapeutyczny z odpowiednią wrażliwością DHFR na podawany antymetabolit (10). W badaniach nad *Plasmodium berghei* oraz badaniach nad innymi rodzajami *Plasmodium* wykazano, że takie AKF jak pirymetamina, pirvopirymidyna, trimetoprim wykazują zupełnie inną aktywność do DHFR pochodzących z komórek pierwotniaczych i inną do analogicznych systemów enzymatycznych pochodzących z komórek bakteryjnych (4). W badaniach nad niskocząsteczkowymi antymetabolitami kwasu foliowego (NAKF) (5), wykazano zmienną międzygatunkową wrażliwość wśród pierwotniaczych pasożytów. Wyjątek pod tym względem stanowi ametoptyryna (10).

Selektywność w działaniu AKF jest ważna, bowiem wykazano, że NAKF w stężeniu IC_{50} jest średnio 5000 razy mniejsza dla reduktaz pierwotniaczych w porównaniu z DHFR zwierzęcymi. Jest to warunek umożliwiający zastosowanie tych związków w lecznictwie.

Badania nad izolowanymi DHFR z komórek pierwotniaczych doprowadziły do stwierdzenia dość dużej specyfiki międzygatunkowej we wrażliwości reduktaz na AKF. Z badań tych wyciągnięto praktyczne wnioski i na ich podstawie w leczeniu inwazji *Toxoplasma sp.* i *Eimeria tenella* znalazły zastosowanie pirymetamina i trimetoprim. DHFR innych rodzajów *Eimeria* nie są wrażliwe na trimetoprim (11), wykazują natomiast wrażliwość na diawerdynę. Z kolei pirymetamina, dwuhydrokwasowy i cykloquanil wykazują wysoką aktywność przeciw-

malaryczną oraz są skuteczne w leczeniu innych zakażeń pierwotniaczych (8, 10, 13).

Skojarzone działanie sulfonamidów z AKF, jako konsekwencja badań Greenberga nad aryloxypirymidynami (5) i dwuaminopirymidynami (6) jako potencjatorami sulfonamidów w leczeniu doświadczalnych inwazji *Plasmodium gallinaceum*, znalazły zastosowanie w zapobieganiu i leczeniu inwazji pierwotniaczych u ludzi i zwierząt. Postępowanie takie odnosi pozytywne skutki w leczeniu malarii, toksoplazmozy, kokcydiozy i jest wynikiem podwójnego bloku w biosyntezie kwasu foliowego i jego pochodnych. Ważny moment takiego postępowania to obniżenie leczniczej dawki sulfonamidu z jednoczesnym zwiększeniem indeksu terapeutycznego, nawet w stosunku do szczepów opornych na sulfonamidy (2, 12). Niejednokrotnie obserwowano przy tak skojarzonym działaniu zmianę efektu bakteriostatycznego na bakteriobójczy (9).

W praktyce najczęściej jako NAKF znalazły zastosowanie diawerdyna i pirymetamina w połączeniu z sulfonamidami w leczeniu inwazji *Eimeria sp.*, *Plasmodium sp.* i *Toxoplasma*. O szerokich możliwościach wykorzystania AKF w profilaktyce i leczeniu schorzeń pierwotniaczych może również świadczyć fakt zastosowania pochodnej pirymidyny (2-hydrokso-4,6-dwumetylopirymidyny) w połączeniu z nitrozwiazkami w leczeniu kokcydiozy. Przykładem jest preparat Nikarbazin produkowany przez firmę Merck-Sharp-Döhme.

W świetle przedstawionych danych z piśmiennictwa wynika, że AKF zastosowane w profilaktyce i terapii zakażeń pierwotniaczych stwarza interesujące perspektywy. Z badań własnych nad nowym AKF wynika, że nowy związek — HPN może działać inhibując w stosunku do DHFR w komórkach pierwotniaczych, tym bardziej, że jak w poprzednich pracach ustalono mechanizm działania HPN jest odmienny od mechanizmów znanych już AKF (13, 15).

Celem obecnie przedstawianych badań było sprawdzenie działania HPN w stosunku do sztucznych i naturalnych zakażeń *Eimeria sp.* Założenia przyjęto na podstawie wcześniej przeprowadzonych badań, wykorzystując w sposób praktyczny przyjętą tezę o tzw. trójstopniowym potencjowaniu sulfonamidów (15).

Materiał i metody

Do badań laboratoryjnych oraz badań terenowych zastosowano preparat zawierający sól sodową sulfadymidyny 0,4 g, trimetoprim 0,02 g, HPN 0,1 g, wit. A 2000 j.m, wit. D₃ 500 j.m, wit. E 2 mg, wit. C 0,1 g oraz nośnik (laktoza) uzupełniający do 100 g.

Do badań porównawczych zastosowano preparat, w którym HPN zastąpiono witaminą K w ilości 0,1 g/100 g preparatu.

Preparaty były przygotowane w serii informacyjnej przez Grodzkie Zakłady Farmaceutyczne „POLFA” pod umowną nazwą Konsulvit-I i Konsulvit-II. Obok nich w opisywanych badaniach stosowano ogólnie dostępne w praktyce terenowej kokcydiostatyki.

Badania terenowe przeprowadzano w fermach drobiu rzeźnego, podając leczniczo Konsulvit-I i Konsulvit-II w początkowym stadium kokcydiozy. Doświadczenia laboratoryjne wykonywano na brojlerach w wieku 3—4 tygodni. Zarówno badania laboratoryjne jak i terenowe ograniczały się do rejestrowania upadków i obserwacji stanu zdrowotnego ptaków.

Układ grup doświadczalnych oraz szczegółowe postępowanie podano w tab. 1 i 2, ilustrujących wyniki prowadzonych doświadczeń.

Wyniki

Doświadczenia laboratoryjne wykonano zakażając ptaki *E. tenella* oraz *Pasteurella multocida* i *E. coli*. Zakażenia bakteryjne wykonano posługując się szczepami terenowymi, izolowanymi z ognisk choroby. Układ grup doświadczalnych, przyjęte postępowanie oraz otrzymane wyniki przedstawia tab. 1, A i B.

Tab. 1. Wyniki doświadczeń nad skutecznością preparatu Konsulvit-I w eksperymentalnym zakażeniu brojlerów *E. tenella* i w zakażeniach bakteryjnych

Zakażenie (Liczba oczyst. w jedno- razowej dawce)	Liczba ptaków w grupie (szt.)	Termin podania Konsulvit-I godziny przed /po zakażeniu	Dawkowanie Konsulvit-I stężenia w wodzie /liczba dni	Procent upadków za cały okres obserwacji	Indeks anty- kokcydialny
A. Wyniki uzyskane po zakażeniu <i>Eimeria tenella</i>					
50 tys.	20	24/-	0,5/7	0	-
	20	24/-	0,2/7	0	-
	20	-	-	0	-
100 tys.	10	24/-	0,5/7	0	-
	10	24/-	0,2/7	0	-
	10	-	-	40	-
150 tys.	20	- /72	0,1/7	5	150,5
	20	- /72	0,2/7	-	178,3
	20	-	-	80	10,9
B. Wyniki uzyskane po zakażeniu bakteryjnym					
<i>Pasteurella multocida</i> 10-6,2	20	24/- w czasie zakażenia	0,2/7	0	
	20	-	0,2/7	0	
	20	- /4	0,2/7	80	
	15	9/-	0,1/7	6,7	
	15	9/-	0,2/7	-	
	15	-	-	100	
<i>E.coli</i> β hem.	22	-	0,1/7	45,4	
	22	w czasie zakażenia	0,2/7	18,2	
	22	-	-	90,9	

Wyniki uzyskane w doświadczeniach laboratoryjnych pozwoliły na ukierunkowanie postępowania w doświadczeniach terenowych, dotyczących przede wszystkim stosowanej dawki. Dawka ta wynosiła 0,2% wodnego roztworu preparatu, podawanego przez okres 5—7 dni. Na podstawie dotychczasowych wyników można było sądzić, iż większą skuteczność leczniczą uzyskujemy wówczas, kiedy preparat podawany był przed wystąpieniem zakażenia lub równocześnie z nim. Wskazanie to uwzględniono w

badaniach terenowych. Wyniki doświadczeń przedstawia tab. 2.

Na podstawie przedstawionych w niej danych, widać, że zastosowanie preparatu Konsulvit-I dawało pozytywne wyniki: w podsumowaniu doświadczeń terenowych preparat ten zastosowano podając go w wodzie do picia dla 16 tys. ptaków, a skuteczność leczenia wyrażała się niskim odsetkiem upadków (1,3%).

Tab. 2. Wyniki doświadczeń terenowych po zastosowaniu badanych preparatów Konsulvit-I i Konsulvit-II

Nr fermy	Liczba leczonych ptaków	Rozpoznanie laboratoryjne		Stosowany lek	Upadki za okres obserwacji	
		<i>Eimeria</i> sp.	zakażenie bakteryjne		szt.	%
I	6000	<i>E. necatrix</i> <i>E. tenella</i>	+	Konsulvit-I	86	1,43
	500	<i>E. necatrix</i> <i>E. tenella</i>	+	Sulfadymidyna Na, 0,2%	16	15,20
II	2600	<i>E. cecullina</i> <i>E. maxima</i> <i>E. tenella</i>	+	Konsulvit-I	32	0,57
III	1558	<i>E. necatrix</i> <i>E. tenella</i>	+	Konsulvit-I	25	1,60
IV	3030	<i>E. necatrix</i> <i>E. tenella</i>	+	Konsulvit-I	27	0,89
	3130	<i>E. necatrix</i> <i>E. tenella</i>	+	*)	116	3,80
V	3000	<i>E. tenella</i> <i>E. cecullina</i>	++ <i>E. coli</i>	Konsulvit-I	39	1,30
	2500	<i>E. tenella</i> <i>E. cecullina</i>	++ <i>E. coli</i>	Sulfadymidyna Na, 0,2%	102	4,08
		<i>E. cecullina</i>	<i>E. coli</i>	—	—	—
VI	3000	<i>E. tenella</i>	++	Konsulvit-II	193	6,43
	4000	<i>E. cecullina</i> <i>E. tenella</i>	<i>E. coli</i> +	—	—	—
		<i>E. cecullina</i>	<i>E. coli</i>	Sulfatyf	89	2,23

W grupach kontrolnych, leczonych dostępnymi kokcydiostatykami, wśród których przeważała sól sodowa sulfadymidyny wykazano mniejszą skuteczność preparatów; upadki wynosiły 3,8%. Istotny jest także wynik grupy kontrolnej, w której zastosowano Konsulvit-II: upadki były tu największe i wynosiły 6,4%.

Z obserwacji ferm objętych doświadczeniami wynika, że po zakończonym leczeniu preparatem Konsulvit-I nie stwierdzano nawrotów choroby. Ważny jest również fakt, iż po jego podaniu zahamowanie upadków następowało już w ciągu 1—2 dni, podczas gdy w grupach otrzymujących tradycyjnie stosowane kokcydiostatyki, okres ten był dłuższy i trwał przeciętnie 5—7 dni.

W doświadczeniach terenowych wielokrotnie stwierdzano zakażenia mieszane, polegające na tym, że obok różnych rodzajów *Eimeria* sp. notowano intensywne zakażenia beta hemolitycznym szczepem *E. coli* oraz inne zakażenia bakteryjne. Zakażenia te były wynikiem niewłaściwych warunków środowiskowych jakie z reguły notowano w objętych badaniami fermach drobiu.

Omówienie wyników

W badaniach własnych przedstawiono wyniki praktycznego zastosowania nowego antymetabolitu kwasu foliowego, jakim jest wcześniej przez nas opisywany HPN (13, 15). Można twierdzić,

że zastosowanie trzech antymetabolitów kwasu foliowego daje pozytywne wyniki w leczeniu kokcydiozy drobiu rzeźnego, ponieważ zastosowanie preparatu kontrolnego, jakim był Kosulvit-II, zawierającego tylko dwa antymetabolity (sulfadymidynę i trimetoprim) było znacznie mniej terapeutycznie skuteczne (tab. 2).

Wyniki własnych badań były potwierdzane w piśmiennictwie. Istnieje szereg prac, z których wynika, że niskocząsteczkowe antymetabolity kwasu foliowego w połączeniu z sulfonamidami są skuteczne w leczeniu kokcydiozy. Większość ze stosowanych do tych celów antymetabolitów zawiera pierścień pirymidynowy, w którym podstawniki przy C-2 i C-4 zawierają grupy aminowe (diawerydyna, pirymetamina). Analogiczną strukturę posiada również badany przez nas związek, określany skrótem HPN. Związek oznaczany skrótem HDP (2-hydroksy-4,6-dwumetylopirymidyna) jest również antymetabolitem kwasu foliowego i od 1955 r. w połączeniu z 4-4-dwunitrokarbanilidem stosowany jest w profilaktyce kokcydiozy drobiu (1, 14).

W badaniach własnych zastosowanie trimetoprimu było podyktowane założeniem, że Kosulvit-I w takim układzie może działać wielokierunkowo nie tylko przeciwko kokcydiom, ale również może być skuteczny w leczeniu zakażeń bakteryjnych. Wnioskowanie takie oparto na wynikach wcześniejszych badań własnych (13), jak również na cytowanych w niniejszej pracy wynikach przedstawionych w tab. 1.

Zastosowanie NAKF w profilaktyce i leczeniu kokcydiozy ma cały szereg zalet. Między innymi narastanie oporności w stosunku do sulfonamidów stosowanych łącznie z NAKF nie następuje szybko. Wiadomo, że większość kokcydiostatyków w przeciągu 1—2 lat staje się bezużyteczna z uwagi na pojawianie się lekoopornych szczepów *Eimeria* sp. Tym też tłumaczy się wprowadzanie naprzemiennego podawania znanych już kokcydiostatyków, przedłużając tym samym ich użyteczność (tzw. „shuttle program”). A zatem można sądzić, że stosowanie NAKF będzie bardziej korzystne w zapobieganiu kokcydiozie niż uzyskuje się to dotychczas za pomocą znanych kokcydiostatyków.

Dodatkową korzyścią wynikającą ze stosowania NAKF jest wielokrotne zmniejszenie dawki terapeutycznej sulfonamidu, z jednoczesnym zwiększeniem jej skuteczności. Dla przykładu dzienna dawka lecznicza sulfadymidyny (sól sodowa) stosowana w 3—4 tygodni życia ptaka wynosi 100 mg. Ten sam sulfonamid podawany wraz z antymetabolitem może być stosowany w mniejszej ilości. We własnych badaniach stosując HPN i TMP dawka sulfadymidyny w analogicznym terminie leczenia kokcydiozy wynosiła 40 mg dziennie dla jednego ptaka. A więc tą drogą można 2—3-krotnie obniżyć dawkę sulfonamidu.

Przedstawione badania upoważniają do stwierdzenia, że zastosowanie sulfonamidów

wraz z AKF (w naszym przypadku z HPN) stwarza szersze możliwości w leczeniu kokcydiozy niż ma to miejsce dotychczas, gdy stosowane związki chemiczne działające na innej zasadzie, prowadzą szybko do wystąpienia lekooporności.

Piśmiennictwo

1. Barber C. W.: Cornell Vet. 45, 369, 1955.
2. Basu P. C., Mondal M. M.: Indian J. Malaria, 16, 157, 1962.
3. Clarke M. L.: Vet. Rec., 74, 845, 1962.
4. Ferone R., Burchall G. J., Hitchings G. H.: Pharmacol. 5, 49, 1969.
5. Greenberg J., Richeson E. M.: J. Pharmacol. Exp. Therap. 99, 444, 1950.
6. Greenberg J., Richeson E. M.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 77, 174, 1951.
7. Gutteringe W. E., Trigg P. I.: J. Protozol., 17, 89, 1970.
8. Hitchings G. H., Burchall J. J.: Adv. Enzymology, 27, 417, 1965.
9. Hitchings G. H., Burchall J. J.: Proc. 3th Inter. Pharmacol. Meeting Sao Paulo v. 5, 3, 1966.
10. Hitchings G. H.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 186, 444, 1971.
11. Jukes H., Broquist H. P.: Metabolic A Inhibitors vol. 1. Acad. Press, N. Y., 1963.
12. Laing A. B. G.: Brit. Med. J. 1, 905, 1965.
13. Mazurczak J., Owczarczyk B.: Badania nad zastosowaniem nowego antymetabolitu kwasu foliowego w profilaktyce zakażeń bakteryjnych, cz. III, Medycyna Wet. 1977 (w druku).
14. Morrison W. D., Ferguson A. E., Cornell M. C., Mc. Gregor J. K.: Avian Dis., 5, 222, 1961.
15. Owczarczyk B., Mazurczak J.: Badania nad zastosowaniem nowego antymetabolitu kwasu foliowego w profilaktyce zakażeń bakteryjnych, cz. II, Medycyna Wet. 1977, (w druku).
16. Wood R. C., Ferone R., Hitchings G. H.: Biochem. Pharmacol. 6, 113, 1961.

Adres autora: prof. dr Jerzy Mazurczak, ul. Nowoursynowska 166, 02-766 Warszawa.

Мазурчак Е., Овчарчик Б., Грабовский Я., Мазуркевич М. — Попытка применения HPN для профилактики и лечения кокцидиоза домашней птицы.

В проведенных исследованиях показали возможность практического применения нового антимабола фолевой кислоты в профилактике и лечении кокцидиоза домашней птицы, подвергающейся забою. HPN, применяемый вместе с сульфадимидином и триметопримом, является препаратом большей эффективности чем общедоступные в местной практике кокцидиостатики. Удобством, вытекающим из применения такой системы, является многократное уменьшение терапевтической дозы сульфонида с одновременным увеличением ее эффективности. Применение сульфонида с АКФ создает более широкие возможности в лечении кокцидиоза, так как растет сопротивляемость по отношению к сульфонидам, применяемым с NAKF, не отмечается так быстро, как в случае общеприменяемых кокцидиостатиков.

Mazurczak J., Owczarczyk B., Grabowski J., Mazurkiewicz M. — Attempts to apply HPN to prophylaxis and treatment of coccidiosis in hens.

The possibility to apply to practice a new anti-metabolite of folic acid in prophylaxis and treatment of coccidiosis in slaughter poultry was examined. HPN together with sulphadimidine and trimetoprim was a better drug than others used in common practice. It allowed to decrease many times the dose of sulphamides bringing about simultaneously an increase of its efficacy. The administration of sulphamides with AKF enabled to obtain better results in the treatment of coccidiosis, because the appearance of resistant parasites against sulphamides used with NAKF was not so rapid as in case of the administration of other coccidiostatics.